

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DialogIP

Use of secondary metabolites of freshwater and marine organisms - e.g. isolated from cyanobacteria or starfish, as natural antifouling agents.

Patent Assignee: ABARZUA S; JAKUBOWSKI S

Inventors: ABARZUA S; JAKUBOWSKI S

Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
DE 19646324	A1	19970528	DE 1046324	A	19961109	199727	B

Priority Applications (Number Kind Date): DE 1046324 A (19961109)

Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
DE 19646324	A1		16		

Abstract:

DE 19646324 A

Use of secondary metabolites of freshwater and marine organisms, as natural antifouling agents, is new.

USE- The secondary metabolites may be used for protection of, e.g., ship hulls, navigational aids and off-shore facilities against fouling by, e.g., algae, mussels and bacteria.

ADVANTAGE- The secondary metabolites, which may include the compounds cyanobacterin and thornasterol A sulphate, are non-toxic, are easy to handle, are effective in low concentrations and may be produced in large quantities.

Dwg.0/0

Derwent World Patents Index

© 2001 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 11312767

THIS PAGE BLANK (USPTO)



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 **Offenlegungsschrift**
①0 **DE 196 46 324 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
A 01 N 63/02
C 09 D 5/16
// C 09 D 133/00,
131/02, C 12 P 17/16,
33/00

②1 Aktenzeichen: 196 46 324.6
②2 Anmeldetag: 9. 11. 96
④3 Offenlegungstag: 28. 5. 97

DE 196 46 324 A 1

Mit Einverständnis des Anmelders offengelegte Anmeldung gemäß § 31 Abs. 2 Ziffer 1 PatG

⑦1 Anmelder:

Abarzua, Sibylle, Priv.-Doz. Dr.rer.nat.habil., 18057
Rostock, DE; Jakubowski, Sabiene, Dr.rer.nat., 18057
Rostock, DE

⑦2 Erfinder:

gleich Anmelder

Rechercheantrag gem. § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt

⑤4 Verwendung biogener Wirkstoffe aus dem Cyanobacterium *Scytonema hofmanni* und dem Gemeinen Seestern *Asterias rubens* als natürliche Antifouling-Wirkstoffe

⑤7 Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren der Einbettung von biogenen Wirkstoffen aus Cyanobakterien und Seesternen in bestimmte Beschichtungen von Oberflächen, um eine Besiedlung dieser durch Bewuchsorganismen zu verhindern. Als Modellbewuchsorganismus wird die Kieselalge *Nitzschia pusilla* gewählt. Bei den biogenen Wirkstoffen handelt es sich um Rohcyanobacterin, gewonnen aus dem im Süßwasser vorkommenden benthischen Cyanobacterium *Scytonema hofmanni* und um Rohsaponin, gewonnen aus dem marinen Gemeinen Seestern *Asterias rubens*. Die o. g. Antifoulingwirkstoffe werden in die Beschichtungen, die die Oberflächen umgeben, in 0,25%-2,5% Gewichtsprozenten appliziert. Mögliche Anwendungsgebiete sind die Schifffahrt, See- und Hafenbau sowie offshore-Technik. Der Vorteil dieser natürlichen Antifoulingwirkstoffe besteht im Gegensatz zu den herkömmlichen giftigen Bioziden darin, daß sie aus Süßwasser- und Meeresorganismen gewonnen werden, nicht toxisch und somit von entscheidender Bedeutung für die Entlastung der Umwelt sind. Sie sind in großen Mengen verfügbar, in geringen Konzentrationen einsetzbar und einfach in ihrer Handhabung.

DE 196 46 324 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Beschreibung

Die Erfindung mit der Bezeichnung "Verwendung biogener Wirkstoffe aus dem Cyanobacterium *Scytonema hofmanni* und dem Gemeinen Seestern *Asterias rubens* als natürliche Antifouling-Wirkstoffe" betrifft den Einsatz o.g. Wirkstoffe als Antifouling-Wirkstoffe zum Schutz von Oberflächen gegen den Bewuchs durch Foulingorganismen.

Unterwasserstrukturen wie z. B. Schiffsrümpfe, Seezeichen, Hafen- und off-shore-Anlagen müssen aus ökonomischen und ökologischen Gründen gegen den Bewuchs (Fouling), der aus einer komplexen Schicht von Foulingorganismen wie Bakterien, Mikroalgen, Makroalgen, Seepocken und Muscheln besteht, geschützt werden. Insbesondere bei Schiffen erhöht sich durch den Bewuchs des Schiffsrumpfes der Reibungswiderstand im Wasser, was zu einem größeren Treibstoffverbrauch, erhöhter Korrosionsanfälligkeit und erhöhter CO₂-Emission führt. Die Dockungsintervalle verkürzen sich; die Unterhaltungs- und Wartungskosten erhöhen sich.

Das auf diesem Gebiet weltweit vorwiegend praktizierte und effektivste Verfahren besteht deshalb in einer Beschichtung der entsprechenden Oberflächen mit hochgiftigen Antifoulinganstrichen. Der Antifoulinganstrich besteht in der Regel aus einem Bindemittel, einem oder mehreren hochgiftigen Bioziden und Pigmenten.

Als Bindemittel werden z. B. Kolophonium, Fettsäurederivate, Poly(meth)acrylate, Polyester, Polyurethane, Epoxidverbindungen, Chlorkautschuk, Harze oder andere, filmbildende Systeme eingesetzt. Innerhalb der Biozide werden wegen der biologischen Vielfalt der als Bewuchsorganismen in Frage kommenden Tier-, Pflanzen- und Mikroorganismengruppen Breitbandgifte (vorwiegend Schwermetalle und in jüngster Zeit vor allem Kupfer (I) salze wie z. B. Kupfer (I)-oxid oder organische Zinnverbindungen wie z. B. Tributylzinnnoxid) verwendet. Als Pigmente werden entweder schwer wasserlösliche Pigmente wie z. B. Zinkoxid oder wasserunlösliche Pigmente wie z. B. Titandioxid oder Eisenoxid verwendet. Die wasserunlöslichen Pigmente verzögern hierbei aufgrund ihrer Eigenschaften die schnelle Auflösung des Farbsystems.

Die Entwicklung von Antifouling-Anstrichstoffen führte zu nachfolgenden verschiedenen Typen (Holzapfel & Rother 1988):

1. Antifoulings mit löslicher Matrix (Bindemittel : Kolophonium, Fettsäurederivate):

Gleichzeitiges Herauslösen von Biozid und Bindemittel, Bewuchsschutzvermögen durch kontinuierliche Biozidabgabe bis zur Grenze der Lebensdauer der Schicht, relative kurze Lebensdauer der Schicht, weiche Antifoulingsschicht, Rauigkeitsanstieg.

2. Antifoulings mit unlöslicher Matrix (Bindemittel: Chlorkautschuk, Vinylharze):

Biozid diffundiert aus Bindemittelmatrix heraus, keine gleichmäßige Biozidabgabe durch unterschiedliches Konzentrationsgefälle, verbrauchte Antifoulingsschicht muß entfernt werden, Rauigkeitsanstieg.

3. Selbstpolierende Antifoulings (Bindemittel: zinnhaltige Acrylatcopolymere):

Biozid wird durch Hydrolyse des Bindemittels kontinuierlich freigesetzt, die verbleibende Polymermatrix ist wasserlöslich und wird "abpoliert".

Der Einsatz von Bioziden in den beiden erstgenannten Typen ist in hoher Konzentration erforderlich, in selbstpolierenden Antifoulings in deutlich geringerer Konzentration zweckmäßig.

Die o. g. Breitbandgifte bewirken jedoch neben der Verhinderung der Ansiedlung von Foulingorganismen auch gravierende Schäden an "Nichtzielorganismen" (z. B. Immunschwäche und verminderte Fortpflanzungsfähigkeit bei Fischen, Sterilität bei Schnecken und Muscheln) und belasten damit unsere Gewässer erheblich. Somit zeichnet sich die Notwendigkeit des Einsatzes alternativer Methoden zur Foulingbekämpfung ab.

Die außerordentlich vielfältigen Versuche, alternative Strategien zum Einsatz von kupfer- und zinnfreien Antifoulings zu entwickeln, haben zu einer Vielzahl von verschiedenen physikalisch/mechanischen, physikalisch/chemischen und biologisch/biochemischen Ansätzen der Bewuchsverhinderung geführt, die in der Praxis jedoch noch nicht voll einsetzbar sind (Von Oertzen et al. 1989, Abarzua & Jakubowski 1995).

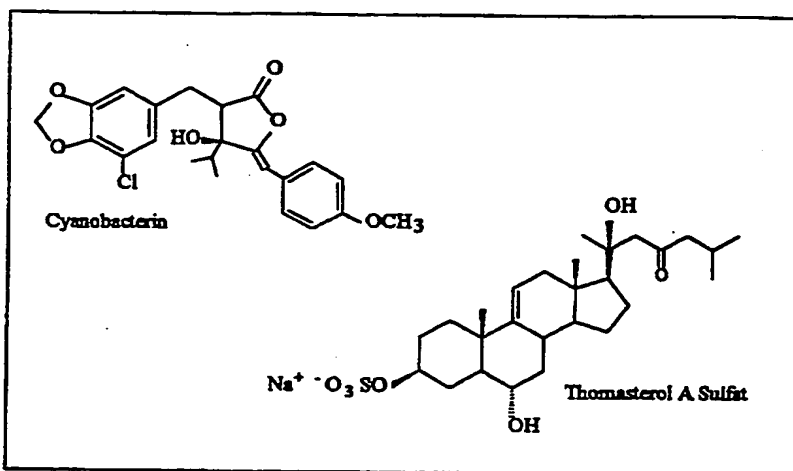
Innerhalb der biologisch/biochemischen Methoden zur Foulingbekämpfung scheint die Substitution der für Antifoulinganstriche verwendeten giftigen Biozide durch biogene, nicht toxische Wirkstoffe die aussichtsreichste und umweltschonendste Methode der Bewuchsverhinderung zu sein (Abarzua & Jakubowski 1995).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, biogene Wirkstoffe aus Süßwasser- und Meeresorganismen zu isolieren und in bestimmte Beschichtungen von Oberflächen einzubetten, um eine Besiedlung dieser durch Bewuchsorganismen zu verhindern, ohne toxische Effekte hervorzurufen. Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die biogenen Wirkstoffe aus benthischen Cyanobakterien (Blualgen) und marinen Invertebraten (Wirbellose) isoliert werden, von denen bekannt ist, daß sie eine Reihe von Sekundärmetaboliten produzieren, die sie gegen Bewuchsdruck schützen können. Als Ergebnis des Screenings von 30 benthischen Cyanobakterien- und marinen Invertebratenspecies kristallisierten sich das benthische Cyanobacterium *Scytonema hofmanni* und der marine Gemeine Seestern *Asterias rubens* als effektive Produzenten von spezifischen Wirkstoffen zum Schutz gegen Bewuchsdruck heraus. Als Modellbewuchsorganismus im Labor wird die Kieselalge *Nitzschia pusilla* verwendet.

Nach Aufkonzentrierung und chromatographischer Reinigung der Extrakte können Sekundärmetabolit isoliert werden, für die in der Literatur bislang folgende Strukturen vorgeschlagen werden:

Cyanobacterin, isoliert aus
dem Cyanobacterium
Scytonema hofmanni

- Thornasterol A Sulfat, ein
Saponinbestandteil, isoliert
aus dem Gemeinen See-
stern *Asterias rubens*.



Erfindungsgemäß sind organische Lösungsmittel wie Ether, Hexan, Benzen, Ethanol, Chloroform, Xylol oder Naphtha geeignete Lösungsmittel für Cyanobacterin; Essigsäurebutylester und Essigsäurepropylester für Saponine.

Die Isolierung (Extraktion) der spezifischen Sekundärmetabolite aus dem benthischen Cyanobacterium *Scytonema hofmanni* und dem Gemeinen Seestern *Asterias rubens* und deren biologische Testung auf die Kieselalge *Nitzschia pusilla* (Agardiffusionstest, Adhäsionstest, Toxizitätstest) soll an folgenden Ausführungsbeispielen erläutert werden.

Beispiel 1

Kultivierung von *Scytonema hofmanni*

Scytonema hofmanni Ag. UTEX B 1581 wird von der Austin Collection der Universität Texas (USA) bezogen. *S. hofmanni* wird in einem Cyanobacterienmedium nach Jüttner et al. (1983) ($\text{pH} = 7,7$) bei 25°C und Dauerlicht ($15 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) in Batchkultur kultiviert. Die Belüftung erfolgt durch ein Luft/ CO_2 -Gemisch (0,3 Vol.-%). Die die biogenen Wirkstoffe produzierenden Cyanobakterien werden nach 21 Tagen Kultivierung geerntet.

Beispiel 2

Isolierung von Rohcyanobacterin (Extraktion von *S. hofmanni*)

Die Zellen von *S. hofmanni* werden filtriert, das dabei entstehende Pellet in kleine Teile zerschnitten. Die Frischmasse wird in Tris-HCl-Puffer ($\text{pH} = 7,5$) resuspendiert, im Ultraschallbad homogenisiert, zentrifugiert und erneut filtriert, anschließend lyophilisiert und gemahlen. 1 g lyophilisierte und gemahlene Trockenmasse von *S. hofmanni* wird mit 50 ml TBE, Chloroform, Benzen oder Hexan für 30 min im Ultraschallbad extrahiert und 2 x bei Raumtemperatur reextrahiert. Nach Zentrifugation werden die Rohextrakte vereinigt, filtriert und die zurückbleibende Rohcyanobacterinlösung bis zur Trockne eingengt.

Beispiel 3

Sammeln von *Asterias rubens*

Mehrere Kilogramm des Gemeinen Seesterns *Asterias rubens* (Größe 3–15 cm) werden in der Ostsee (Dänische Ostseeküste, Kleiner Belt, Fredericia) in ca. 20 m Tiefe gesammelt.

Beispiel 4

Isolierung von Rohsaponin (Extraktion von *A. rubens*)

Die frischen Seesterne werden gesäubert, mit Ethanol (Endkonzentration 80%) übergossen und über Nacht stehengelassen. Der Rohextrakt wird nach Filtration über Papierfilter auf 1/3 des Gesamtvolumens im Vakuum eingengt und anschließend mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wird abgetrennt und die Rohsaponine durch Ausfällen mit Aceton aus der zur Trockne eingengten wäßrig-ethanolischen Extraktlösung als kompakter weißer Niederschlag gewonnen. Im Anschluß erfolgt eine Reinigung der Rohsaponine durch Ausfällen von störenden Begleitstoffen (Makromoleküle, Salze) aus der wäßrigen Rohsaponinlösung mit Ethanol. Die störenden Stoffe werden als kristalliner Niederschlag abfiltriert und die zurückbleibende wäßrige aufgereinigte Rohsaponinlösung wird im Vakuum zur Trockne eingengt.

Beispiel 5

Kultivierung von *Nitzschia pusilla*

- 5 Mit *Nitzschia pusilla* wird eine typische Art der im Mikrofoulingbewuchs vorkommenden Kieselalge gewählt. *N. pusilla* wird in Batchkultur bei 15°C und Dauerlicht ($20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Lichtkühlkammer) in einem ASW-Medium (artificial seawater medium) (Van Baalen 1962) (pH = 7,8) axenisch kultiviert. Da *N. pusilla* durch Probenahmen aus Schlickwatten des Jadebusens, Teilbereich Dangast und Vareler Außenhafen (Nordsee) gewonnen und anschließend isoliert wird, ist neben einer sterilen Anzucht die kontinuierliche Behandlung mit
- 10 einer Antibiotika-Lösung (Streptomycin: Penicillin: Amphotericin = 40 : 20 : 0,25; bei Einsatz von $4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Streptomycin) notwendig (Round et al. 1990). Belüftet wird mit einem Luftgemisch (0,03 Vol.-% CO_2).

Beispiel 6

Agardiffusionstest mit *N. pusilla*

- 15 Der Agardiffusionstest mit der Kieselalge *N. pusilla* wird zum Screening verschiedener Extrakte von *S. hofmanni* und *A. rubens* auf Wachstumsinhibierungseffekte genutzt. Die Agarplatten werden wie folgt vorbereitet: 10 ml Nährmedium, bestehend aus ASW-Medium (Van Baalen 1962) unter Zusatz von 1,5% Agar werden
- 20 steril in Petrischalen (\varnothing 50 mm) gegossen. Nach dem Abkühlen der Agarplatten werden 0,2 ml einer Suspension von *N. pusilla* aus der logarithmischen Phase ($4-5 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot \text{ml}^{-1}$) (siehe Beispiel 5) gleichmäßig auf die Agarplatten ausgespatelt. Nach dem Trocknen der Algensuspension erfolgt das Ausstanzen eines Loches (\varnothing = 7 mm) aus der Agarschicht mit einem abgeflamten Korkbohrer im Zentrum der Agarplatte. Das durch
- 25 verschiedene Extraktionsmittel gewonnene Rohcyanobacterin aus *S. hofmanni* (siehe Beispiel 2) wird in tert-Butylmethylether (TBE), das Rohsaponin aus *A. rubens* in Aqua dest. (siehe Beispiel 4) in einer Konzentration von $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ gelöst. Zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration werden aus diesen Lösungen entsprechende Verdünnungen hergestellt. Die Menge der applizierte Extraktlösung pro Petrischale beträgt in allen Fällen 50 μl . Die Wachstumshemmung wird vom Rand des Loches bis zum Rand der Hemmzone (in mm) nach 8
- 30 Tagen Inkubation (3 Parallelen) in der Lichtkühlkammer für Kieselalgen (15°C, $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) gemessen. Die Wachstumshemmung der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle wird subtrahiert.
- Tabelle 1 zeigt den Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen des durch verschiedene Extraktionsmittel gewonnenen Rohcyanobacterins aus *S. hofmanni* auf das Wachstum von *N. pusilla*.

Tabelle 1

Extraktionsmittel	Testlingsmittel	Rohcyanobacterinkonzentration (mg · ml ⁻¹)	Rohcyanobacterinkonzentration (µg pro Agarplatte)	Wachstumshemmung
TBE	TBE	100	5000	++++
		20	1000	++++
		2	100	+++
		0,2	10	+++
		0,02	1	+++
		0,002	0,1	++
		0,0002	0,01	-
Chloroform	TBE	100	5000	++++
		20	1000	++++
		2	100	++++
		0,2	10	++++
		0,02	1	+++
		0,002	0,1	++
		0,0002	0,01	-
Benzen	TBE	100	5000	++++
		20	1000	++++
		2	100	++++
		0,2	10	++++
		0,02	1	+++
		0,002	0,1	++
		0,0002	0,01	-
Hexan	TBE	100	5000	++++
		20	1000	++++
		2	100	++++
		0,2	10	++++
		0,02	1	+++
		0,002	0,1	++
		0,0002	0,01	-

Erläuterungen:

Hemmzone in mm:

0

0,50 - 2,75

3,00 - 6,50

6,75 - 11,00

> 11,00

Bezeichnung der Wachstumshemmung:

- keine Hemmung

+ schwache Hemmung

++ mittelstarke Hemmung

+++ starke Hemmung

++++ sehr starke Hemmung

Aus Tabelle 1 ist deutlich zu erkennen, daß das Rohcyanobacterin aus *S. hofmanni*, unabhängig vom verwendeten Extraktionsmittel, eine starke Wachstumshemmung auf *N. pusilla* ausübt. Mit steigender Konzentration nimmt die Wachstumshemmung zu, wobei 0,002 mg · ml⁻¹ (= 0,1 µg pro Agarplatte) in allen Fällen die minimale Hemmkonzentration ausmacht.

Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 2) zeigt den Effekt unterschiedlicher Konzentrationen des Rohsaponins von *A. rubens* auf das Wachstum von *N. pusilla*.

Tabelle 2

Extraktions- mittel	Testlösungs- mittel	Rohsaponin- konzentration (mg · ml ⁻¹)	Rohsap nin- konzentration (µg pro Agarplatte)	Wachstums- hemmung
Ethanol	Aqua dest.	100	5000	++++
		20	1000	++++
		2	100	++
		0,2	10	-
		0,02	1	-
		0,002	0,1	-
		0,0002	0,01	-

Erläuterungen: siehe Tabelle 1

Die minimale Hemmkonzentration beträgt bei dieser Applikation 2 mg · ml⁻¹ (= 100 µg pro Agarplatte).

Beispiel 7

Adhäsionstest mit *N. pusilla*

Zum Testen der Antifoulingaktivität im Labormaßstab wird der Adhäsionstest mit einer 1-Algen-Kultur der Kieselalge *N. pusilla* durchgeführt. *N. pusilla* wird nach 5–6tägiger Kultivierung im Batchverfahren (siehe Beispiel 5) geerntet, in 6 l sterilem ASW-Medium (Van Baalen 1962) aufgenommen und auf eine Zellzahl von ~ 2 · 10⁶ Zellen · ml⁻¹ eingestellt. Danach wird diese Algensuspension auf sterile Erlenmeyerkolben (200 ml) mit Weithals (5 cm) verteilt. Vorbereitung der PVC-Plättchen: PVC-Plättchen (20 × 40 mm), die an den Seiten mit 2 kleinen Löchern versehen sind, werden mit 2 Schichten einer Mischung aus Bindemittel + Extrakt (Rohcyanobacterin bzw. Rohsaponin) bzw. Bindemittel + Lösungsmittel im Verhältnis 40 : 1 (1 g Bindemittel + 25 mg Extrakt/0,25 ml Lösungsmittel) bzw. Bindemittel pur gestrichen, an den Seiten festes Garn durchgezogen und 24 Std. hängend getrocknet. Der Extrakt wird, wenn nicht anders gekennzeichnet, in einer Konzentration von 100 mg · ml⁻¹ appliziert, d. h. für ein Verhältnis von Bindemittel : Lösungsmittel = 40:1 wird der Extrakt in 2,5% Gewichtsprozenten appliziert. Die PVC-Plättchen werden in o. g. Algensuspension von *N. pusilla* getaucht (Plättchen müssen vollständig bedeckt und aufrecht sein). Danach werden die mit der Algensuspension von *N. pusilla* und den PVC-Plättchen versehenen Erlenmeyerkolben für 5–90 Tage bei 15°C und Dauerlicht (20 µE · m⁻² · s⁻¹) (Lichtkühlkammer) inkubiert. Dabei werden die Suspensionen von *N. pusilla* mit den entsprechenden PVC-Plättchen im Kreisschüttler bei 180 U · min⁻¹ geschüttelt.

Nach 5–90tägiger Inkubation der PVC-Testplättchen erfolgt die Auswertung des Adhäsionstestes in Form einer visuellen Einschätzung (Bewuchs in %; Hemmung des Bewuchses in %) und durch exakte Ermittlung der Zellzahl im Bewuchs. Dazu wird der Bewuchs mit Gummischwämmen sanft abgeschabt, in 5 ml sterilem Aqua dest. aufgenommen und mit 0,5 ml Lugolscher Lösung fixiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mittels der Zählkammer nach THOMA unter dem Lichtmikroskop (Olympus CH-2).

Beispiel 8

Adhäsionstest mit *N. pusilla* unter Einsatz verschiedener Bindemittel-/Lösungsmitteln kombinationen

Die Auswahl eines geeigneten Trägers für den Wirkstoff d. h. eines Bindemittels, spielt eine ganz entscheidende Rolle für dessen Erfolg als Antifoulingssystem. Weiterhin ist auch die Verwendung eines geeigneten Lösungsmittels zum Lösen des Wirkstoffes und zum Einbinden in den Anstrich von großer Bedeutung. Es müssen die nachfolgend zusammengestellten Kriterien für die Verwendung der entsprechenden Binde- und Lösungsmittel im Adhäsionstest beachtet werden:

Bindemittel	Lösungsmittel	Mischung aus Binde- und Lösungsmittel
<p>sollte</p> <ul style="list-style-type: none"> • nicht toxisch wirken • keine chemischen Wirkungen mit dem Wirkstoff eingehen, die dessen Wirkung außer Kraft setzen bzw. reduzieren • über gute Filmbildungs- und Haltbarkeitseigenschaften verfügen (Bindemittel muß mechanisch stabil sein) 	<p>sollte</p> <ul style="list-style-type: none"> • den Wirkstoff (Extrakt) gut lösen • gute Löslichkeit und Vermischung mit dem jeweiligen Bindemittel ermöglichen • nicht toxisch wirken (keine Wachstums- und Adhäsionshemmung) 	<ul style="list-style-type: none"> • gute Filmbildung • kein toxischer Effekt (keine Wachstums- und Adhäsionshemmung)

Hinsichtlich dieser Kriterien werden zahlreiche Versuchsserien mit unterschiedlichen Kombinationen von Binde- und Lösungsmitteln durchgeführt und ausgewertet.

Als Bindemittel werden in diesen Versuchen eingesetzt:

— die Farbmuster B und E der Firma BÜFA—BAEUERLE, Vinylharz rot, Vinylharz weiß, Acrylharz rot und Acrylharz weiß der Firma BROHL CHEMIE.

Zum Vergleich wird der spezielle Antifoulinganstrich Clean-Snip 200, 522—4039 als repräsentativer kommerzieller Antifoulinganstrich mitgeführt.

Als Lösungsmittel kommen zum Einsatz:

— Ethanol, Naphtha, Glycolether, Xylol

Folgende Tabellen (Tabelle 3 und 4) zeigen einen Ausschnitt aus den Versuchsserien. Als beste Kombination von Bindemittel/Lösungsmittel hinsichtlich der o. g. Kriterien kristallisiert sich dabei die Mischung aus Vinylharz weiß und Naphtha heraus (vgl. Tabelle 3 und 4), da:

1. eine gute Löslichkeit und Vermischung von Vinylharz weiß und Naphtha sowie eine gute Filmbildung gewährleistet sind (Tabelle 4)
2. ein starker Bewuchs induziert wird, der auf weißem Untergrund gut sichtbar ist und der nach 90 Tagen noch stabil ist (Tabelle 4)
3. Vinylharz weiß als Bindemittel mechanisch stabil ist (gehört zu den Antifouling mit unlöslicher Matrix) (Tabelle 4)
4. keine toxischen Effekte festgestellt werden (Tabelle 4)
 - kein Anheftungshemmung
 - keine Wachstumshemmung (vgl. Beispiel 10a))
5. sich fast alle Extrakte gut in Naphtha lösen (Ausnahme: wäßriger Extrakt von *A. rubens*, hier Lösungsmittel Essigsäurebutylester)

Mit dieser Mischung aus Vinylharz weiß und Naphtha wird daraufhin der Adhäsionstest mit *N. pusilla* unter Einbettung des im Beispiel 9 aufgeführten Rohcyanobacterins aus *S. hofmanni* und des Rohsaponins aus *A. rubens* durchgeführt.

Tabelle 3:

Testung des Einflusses von Binde- und Lösungsmitteln auf den Bewuchs durch *N. pusilla*

Nr.	Bindemittel	Aufnahme- Lösungsmittel zum Einbinden in den Anstrich	Löslich- keit/Film- bildung	Bewuchs der PVC-Plättchen durch <i>N. pusilla</i> nach Tagen			Stabilität des Bindemittels	Absorption nach 28 Tagen		
				5	16	28		A 750	A 680	A 490
1.	Farbmuster B	Ethanol	gut	---	----	----	nein	0,406	0,485	0,547
2.	Farbmuster B	Xylol	gut	--	---	---	nein	0,302	0,327	0,315
3.	Farbmuster E	Ethanol	gut	--	---	---	nein	0,624	0,706	0,784
4.	Farbmuster E	Xylol	gut	-	--	--	nein	0,526	0,670	0,755
5.	Vinylharz rot	ohne	entfällt	--	--	--	ja	0,456	0,536	0,605
6.	Vinylharz rot	Xylol	gut	-	-	-	ja	0,452	0,533	0,646
7.	Acrylharz rot	ohne	entfällt	---	---	---	ja	0,542	0,672	0,775
8.	Acrylharz rot	Xylol	gut	-	-	--	ja	0,560	0,725	0,828
9.	Vinylharz weiß	Ethanol	bedingt	-	---	---	ja	0,540	0,610	0,620
10.	Vinylharz weiß	Xylol	gut	--	--	--	ja	0,574	0,703	0,713
11.	Acrylharz weiß	Ethanol	bedingt	-	--	--	ja	0,522	0,720	0,670
12.	Acrylharz weiß	Xylol	gut	--	--	--	ja	0,358	0,382	0,371
13.	Vergleichsanstrich: Antifoulinganstrich Clean-Ship 200, 522-4039	ohne	entfällt	++++	++++	++++	ja	0,228	0,258	0,323

Erläuterungen:

Bewuchs: + + + + +
 - - - - -
 - - -
 - -
 -

bei Verwendung aller Binde- und Lösungsmittel beständig
 totale Hemmung des Bewuchses (100 %)
 sehr starker Bewuchs (80 %)
 starker Bewuchs (60 %)
 mittelstarker Bewuchs (40 %)
 schwacher Bewuchs (20 %)

Ausgangsabsorption zu
 Beginn des Versuches:
 A750 = 0,262
 A680 = 0,317
 A490 = 0,308

Tabelle 4:

Testung des Einflusses von Binde- und Lösungsmitteln auf den Bewuchs durch *N. pusilla*

Nr.	Bindemittel	Aufnahme- sugsmittel zum Ein- binden in den Anstrich	Löslichkeit/ Filmbildung	Bewuchs der PVC-Plättchen durch <i>N. pusilla</i> nach Tagen				Beständig- keit des Bewuchses nach 90 Tagen	Absorption nach 28 Tagen		
				5	16	28	90		A 750	A 680	A 490
1.	Vinylharz weiß	Ethanol	bedingt	-	---	---	---	nein	0,506	0,592	0,699
2.	Vinylharz weiß	Xylol	gut	--	--	--	--	ja	0,582	0,674	0,772
3.	Vinylharz weiß	Naphtha	gut	---	---	---	---	ja	0,610	0,690	0,850
4.	Vinylharz weiß	Glykolether	gut	--	--	---	kein	nein	0,636	0,733	0,871
5.	Acrylharz weiß	Glykolether	gut	---	---	---	kein	nein	0,769	0,859	0,984
6.	Vinylharz rot	Glykolether	gut	---	---	---	kein	nein	0,589	0,668	0,788
7.	Acrylharz rot	Glykolether	gut	--	--	-	kein	nein	0,709	0,778	0,860
8.	Vergleichsanstrich: Antifoulinganstrich Clean-Ship 200, 522-4039	ohne	entfällt	+++++	+++++	+++++	+++++	entfällt	0,298	0,339	0,390

Erläuterungen : siehe Tabelle 3

Ausgangsabsorption zu Beginn des Versuches:

A750 = 0,237
A680 = 0,273
A490 = 0,311

Alle verwendeten Bindmittel sind mechanisch stabil.

Beispiel 9

Adhäsionstest mit *N. pusilla* unter Einbettung von Rohcyanobacterin aus *S. hofmanni* und Rohsaponin aus *A. rubens*

Durch Extraktion mit TBE gewonnenes Rohcyanobacterin aus *S. hofmanni* wird in einer Konzentration von 10, 50 und 100 mg · ml⁻¹ in Naphtha gelöst, durch Extraktion mit Ethanol gewonnenes Rohsaponin aus *A. rubens* in einer Konzentration von 100 mg · ml⁻¹ in Essigsäurebutylester. Da sich das Rohsaponin aus *A. rubens* am besten in Aqua dest. löst, muß zum Einbinden in den Anstrich Essigsäurebutylester als Lösungsvermittler eingesetzt werden. Die gelösten Extrakte werden anschließend in das Bindemittel Vinylharz weiß im Verhältnis 40 : 1 (1 g Bindemittel + 25 mg Extrakt/0,25 ml Lösungsmittel) eingebettet (vgl. Beispiel 7) und der Bewuchs ausgewertet (vgl. Beispiel 7). Tabelle 5 zeigt die Wirkung von Rohcyanobacterin (100 mg · ml⁻¹) und Rohsaponin (100 mg · ml⁻¹) auf den Bewuchs durch *N. pusilla*.

Bei Einsatz von 100 mg · ml⁻¹ Rohcyanobacterin aus *S. hofmanni* wird eine ca. 98%ige Hemmung des Bewuchses erreicht (siehe Tabelle 5). Die geringe Hemmwirkung des Rohsaponins aus *A. rubens* (100 mg · ml⁻¹) (ca. 55%ige Hemmung des Bewuchses) ist darauf zurückzuführen, daß mit dieser Methode nur 20% der Rohsaponine in den Anstrich eingebunden werden (siehe Tabelle 5).

Bei Einsatz von Rohcyanobacterin unterschiedlicher Konzentrationen aus *S. hofmanni* zeigt sich, daß eine Einbettung einer Konzentration von 10 mg · ml⁻¹ (0,25% Gewichtsprozent) ausreicht, um eine signifikante Inhibierung des Bewuchses zu erreichen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 5:

Wirkung von Rohcyanobacterin ($100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) aus *S. hofmanni* und Rohsaponin ($100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) aus *A. rubens* auf den Bewuchs durch *N. pusilla* (Adhäsionstest)

Ausgangsmaterial	Extraktionsmittel	Bindemittel	Aufnahmelösungsmittel zum Einbinden in den Anstrich	Löslichkeit	Hemmung des Bewuchses der PVC-Plättchen nach Tagen	im Bewuchs vorhandene Zellzahl nach 90 Tagen (Zellen $\cdot 10^6 \text{ml}^{-1}$) in %
Lösungsmittelkontrolle	entfällt	Vinylharz weiß	Naphtha	100 %	60 - 90	61,5 100
Lösungsmittelkontrolle	entfällt	Vinylharz weiß	Essigsäurebutylester	100 %	-	60,5 100
Cyanobacterien <i>S. hofmanni</i>	TBE	Vinylharz weiß	Naphtha	100 %	++++	1,1 1,8
Marine Invertebraten <i>A. rubens</i>	Aqua dest.	Vinylharz weiß	Essigsäurebutylester	20 %	+	27,5 45,5
Vergleichsanstrich: Antifoulinganstrich Clean-Ship 200, 522-4039	entfällt	entfällt	ohne	entfällt	+++++	0,4 0,65

Erläuterungen:

++++ totale Hemmung des Bewuchses
 +++ starke Hemmung des Bewuchses
 ++ mittelstarke Hemmung des Bewuchses
 + schwache Hemmung des Bewuchses
 - sehr schwache Hemmung des Bewuchses
 (95 - 100 %)
 (75 - 95 %)
 (50 - 75 %)
 (25 - 50 %)
 (5 - 25 %)
 (0 %)

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

Tabelle 6:

Wirkung unterschiedlicher Rohcyanobacterinkonzentrationen aus *S. hofmanni* auf den Bewuchs durch *N. pusilla* (Adhäsionstest)

Ausgangsmaterial	Extraktionsmittel	Rohcyanobacterinkonzentration (mg . ml ⁻¹)	Bindemittel	Auflösungsmittel zum Einbinden in den Anstrich	Löslichkeit	Hemmung des Bewuchses der PVC-Plättchen nach Tagen 60 90	im Bewuchs vorhandene Zellzahl nach 90 Tagen (Zellen . 10 ⁶ ml ⁻¹) in %
Lösungsmittelkontrolle	entfällt	entfällt	Vinylharz weiß	Naphtha	100 %	- -	61,5 100
Cyanobacterien <i>S. hofmanni</i>	TBE	100 50 10	Vinylharz weiß	Naphtha	100 %	+++ +++ +++ ++++	1,1 n.g. n.g. 0,4
Vergleichsanstrich: Antifoulinganstrich Clean-Ship 200,522-4039	entfällt	entfällt	entfällt	ohne	entfällt	++++	0,65

Erläuterungen : siehe Tabelle 5

n.g. = nicht getestet

Beispiel 10

Wachstums- und Vitalitätstests mit *N. pusilla*

Um zu klären, ob der Testanstrich im Adhäsionstest nur die Adhäsion der Kieselalge *N. pusilla* verhindert oder aber, ob abgegebene Stoffe durch den Auslaugungseffekt insgesamt die Vitalität der Algen in der Suspension beeinträchtigen, wird zusätzlich das Wachstum und die Vitalität (Prozentsatz an lebenden Zellen) von *N. pusilla* vor, während und nach Inkubation der entsprechenden PVC-Plättchen im Adhäsionstest untersucht. Folgende spezifische Tests werden durchgeführt:

a) Messen der Absorption der Algensuspension

Zur Ermittlung des Wachstums der die PVC-Plättchen umgebenden *N. pusilla*-Suspensionen wird die Absorption am Spektralphotometer bei 750 (Trübung), 680 (Chlorophyll a-Gehalt in vivo) und 490 nm (Carotin-Gehalt in vivo) gemessen.

b) Plattentest

Durch die Anwendung des Plattentests wird die Rekultivierung ("das Wiederaanwachsen") der jeweiligen *N. pusilla*-Suspensionen, in die die entsprechenden PVC-Plättchen mit Bindemittel und Extrakt bzw. Lösungsmittel gehängt werden, auf Agarplatten verfolgt. Die Agarplatten werden, wie unter Beispiel 6 beschrieben, vorbereitet.

c) Vitalfärbungen mit Trypanblau

Der Prozentsatz an lebenden Zellen wird anhand von Vitalfärbungen mit Trypanblau ermittelt (Lindl & Bauer 1994). 50 µl Algensuspension von *N. pusilla* werden mit 50 µl 0,4% Trypanblaulösung versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Zellzahl nicht angefarbter und angefarbter Zellen mittels der Zählkammer nach THOMA unter dem Lichtmikroskop (Olympus CH-2) bestimmt: Lebende Zellen sind nicht angefarbt. Tote Zellen sind durchgängig blau angefarbt. Der Prozentsatz an lebenden Zellen errechnet sich nach folgendem Schema:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$$

Tabellen 7 und 8 zeigen die Ergebnisse der Wachstumstests, die zur Toxizitätsbestimmung neben den Untersuchungen zur Verhinderung von Bewuchs durch Applikation von Rohcyanobacterin aus *S. hofmanni* und Rohsaponin aus *A. rubens* mitgeführt werden.

Die Einbettung von Rohcyanobacterin aus *S. hofmanni* führt bei Verwendung einer Konzentration von 100 mg · ml⁻¹ zur Vitalitätsbeeinträchtigung, die sich im Laufe des Untersuchungszeitraumes verstärkt, was dafür spricht, daß das Rohcyanobacterin allmählich aus dem Bindemittel Vinylharz weiß freigesetzt wird (Auslaugungseffekt) (siehe Tabelle 7).

Bei Applikation von 10 mg · ml⁻¹ ist eine sehr geringe Toxizität zu verzeichnen (siehe Tabelle 8), obwohl die Bewuchshemmung genauso stark ist (Tabelle 6). Durch Vitalfärbungen (Anfärbung mit Trypanblau) wird gezeigt, daß bei Einsatz von 10 mg · ml⁻¹ Rohcyanobacterin keine Toxizität vorliegt (97% der Zellen sind lebensfähig). Im Falle der Einbettung des Rohsaponins aus *A. rubens* (100 mg · ml⁻¹) wird nur eine geringe Toxizität (25%) nachgewiesen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7:

Testung der Toxizität der Testanstriche bei Einbettung von Rohcyanobacterin ($100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) aus *S. hofmanni* und Rohsaponin ($100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) aus *A. rubens* mittels Wachstumstests (Plattentest)

Ausgangs- material	Extraktions- mittel	Binde- mittel	Aufnahmelösungsmittel zum Einbinden in den Anstrich	Löslich- keit	Plattentest nach Tagen	
Lösungsmittel- kontrolle	entfällt	Vinylharz weiß	Naphtha bzw. Essig- säurebutylester	100 %	21	90 +++
Cyanobacterien						
<i>S. hofmanni</i>	TBE	Vinylharz weiß	Naphtha	100 %	+	-
Marine Invertebraten						
<i>A. rubens</i>	Aqua dest.	Vinylharz weiß	Essigsäurebutylester	20 %	++	++
Vergleichsanstrich: Antifoulinganstrich Clean-Ship 200, 522-4039	entfällt	entfällt	ohne	entfällt	-	-

Erläuterungen:

+++ sehr gutes Wachstum (75-100 %) = keine Toxizität (0-25 %)
 ++ gutes Wachstum (50-75 %) = geringe Toxizität (25-50 %)
 + schwaches Wachstum (25-50 %) = starke Toxizität (50-75 %)
 - kein Wachstum (0-25 %) = totale Toxizität (75-100 %)

Tabelle 8:

Testung der Toxizität der Testanstriche bei Einbettung verschiedener Rohcyanobacterinkonzentrationen aus *S. hofmanni* mittels Wachstumstests (Plattentest)

Ausgangs- material	Extraktions- mittel	Rohcyanobacterin- konzentration (mg · ml ⁻¹)	Bindemittel	Aufnahme- lösungsmittel zum Einbinden in den Anstrich	Löslich- keit	Plattentest nach Tagen	
						21	90
Cyanobacterien <i>Scytonema hofmanni</i>	TBE	100	Vinyl- harz weiß	Naphtha	100 %	+	-
		50				+	+
		10				+	+
Vergleichsanstrich Antifoulinganstrich Clean-Ship 200, 522-4039	entfällt	entfällt	entfällt	ohne	entfällt	-	-

Erläuterungen: siehe Tabelle 7

Literatur

- Abarzua, S.; Jakubowski, S. (1995): Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. I. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. Mar. Ecol. Prog. Ser. 123: 301 — 312
- Holzapfel, H.; Rother, J. (1988): Antifouling-Anstrichsysteme für den Schiffbau. Farbe und Raum 4: 120 — 123
- Jüttner, F.; Leonhardt, J.; Möhren, S. (1983): Environmental factors affecting the formation of metisyl oxide, demethylalicyl alcohol and other volatile compounds excreted by *Anabaena cylindrica*. J. Gen. Microbiol. 129: 407 — 412
- Lindl, T.; Bauer, J. (1994): Zell- und Gewebekultur, Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Gustav Fischer Verlag, ISBN 3-437-30736-3, pp. 189-190
- Round, F.E.; Crawford, R.M.; Mann, D.G. (1990): The diatoms. Biology and Morphology of the genera. Cambridge University Press, ISBN 0-521-36318-7, pp. 13

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung von Sekundärmetaboliten aus Süßwasser- und Meeresorganismen als natürliche Antifouling-Wirkstoffe.
2. Verwendung von Sekundärmetaboliten aus Süßwasser- und Meeresorganismen gemäß Anspruch 1, wobei die Sekundärmetabolite durch Extraktion von Cyanobakterien (Blaualgen) gewonnen werden.
- 10 3. Verwendung von Sekundärmetaboliten aus Süßwasser- und Meeresorganismen gemäß Anspruch 1, wobei die Sekundärmetabolite durch Extraktion von marinen Invertebraten (Wirbellosen) gewonnen werden.
4. Verwendung von Sekundärmetaboliten aus Süßwasser- und Meeresorganismen gemäß den Ansprüchen 1 und 2, wobei es sich bei den Süßwasserorganismen um das Cyanobacterium *Scytonema hofmanni* handelt.
- 15 5. Verwendung von Sekundärmetaboliten aus Süßwasser- und Meeresorganismen gemäß den Ansprüchen 1 und 3, wobei es sich bei den Meeresorganismen um den Gemeinen Seestern *Asterias rubens* handelt.
6. Verwendung einer Mischung aus dem Bindemittel Vinylharz weiß und den Lösungsmitteln Naphtha und Essigsäurebutylester zur Einbettung der Antifouling-Wirkstoffe gemäß Anspruch 1.
7. Zubereitung einer Mischung von Rohcyanobacterin aus *Scytonema hofmanni* und Naphtha in Form einer Lösung, Vermischung mit dem Bindemittel Vinylharz weiß zu 0,25% Gewichtsprozenten gemäß den Ansprüchen 1, 2 und 4.
- 20 8. Zubereitung einer Mischung von Rohsaponin aus *Asterias rubens* und Essigsäurebutylester in Form einer Lösung, Vermischung mit dem Bindemittel Vinylharz weiß zu 2,5% Gewichtsprozenten gemäß den Ansprüchen 1, 3 und 5.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65